

氟碳代血液对小鼠巨噬细胞功能和机体抵抗力的影响

张胜年、刘春芳、董竞武、丁训诚 (上海劳动卫生职业病研究所毒理研究室, 上海 200003)

提要 小鼠 iv FCE 50 ml/kg 后用 DNFB 激发的 DHR 降低, PM 对 CRBC 的吞噬%和 PI 减少, 扫描电镜可见 PM 呈活跃状态, 电镜发现 PM 大量吞噬 FCE. 小鼠 ip LPS 同时 iv FCE 30 ml/kg 后死亡率增

加, 若同时再 ip HCA 则死亡率降低. 结果提示 FCE 可继发引起小鼠 PM 功能的抑制, 导致机体抵抗力的一过性降低, 而 HCA 能明显增强 iv FCE 小鼠的抗感染能力.

1984年6月6日收稿 1985年1月22日修回

外文缩写 CRBC 鸡红细胞; DHR 迟发超敏反应; DI 迟发超敏反应指数; DNFB 二硝基氟苯; FCE 氟碳代血液; HCA 醋酸氢化可的松; *E. coli* O₁₁₁B₄-LPS 大肠杆菌内毒素脂多糖; MPS(RES)单核吞噬细胞系统; PI 吞噬指数; PM 腹腔巨噬细胞; PS 生理盐水

关键词 氟碳乳剂; 巨噬细胞; 电子显微镜检查; 内毒素; 氢化可的松; 扫描电子显微镜检查

FCE 是以全氟萘烷和全氟三丙胺 7:3 的比例混合制备而成的超细状乳液, 为一种惰性化合物, 作为异物注入机体后, 暂时滞留在肝脾等

MPS 内,可引起一过性 MPS 封闭^(1,2)。本文研究小鼠 iv FCE 后,体内巨噬细胞的免疫和吞噬功能,机体抗感染能力和皮质激素类药物的抗毒素作用,为评价 FCE 的免疫毒性提供参考。

材 料

FCE 由中国科学院有机化学研究所提供 II 号乳剂,其组成成分(g/l):全氟萘烷(FDC) 140,全氟三丙胺(FTP) 60,表面活性剂(F-68) 27,羟乙基淀粉 30,葡萄糖 1.8, NaCl 6, KCl 0.34, MgCl₂ 0.2, CaCl₂ 0.28, NaHCO₃ 2.1, 氟碳含量实测值为 204 mg/ml。乳剂用磷钨酸负染法由电子显微镜摄片证实,96%的乳粒直径小于 0.2 μm,其中直径小于 0.1 μm 的乳粒约为 35%。本文用同批号乳剂,符合临床应用标准。DNFB 是上海试剂三厂产品,AR。冻干精制 LPS 系用大肠杆菌 O₁₁₁B₄ 的菌悬液制成,由上海生物制品研究所提供。HCA 是上海第九制药厂出品。ICR 小鼠由中国科学院实验动物管理中心供应。

方 法 和 结 果

FCE 对小鼠 DHR 的影响^(3,4) 称取 0.1 g 和 0.05 g DNFB 分别加医用生油-丙酮混合液 10 ml(生油:丙酮=1:2),配成 1%和 0.05%的 DNFB-1:4 医用生油-丙酮液,用 1%DNFB 液 50 μl 涂于小鼠背部去毛区。以此致敏日为 d₀,致敏前为 -d。在 d 3 每鼠 ip [³H] TdR 1 μCi/10 ml/kg, d 4 以 0.5%上述 DNFB 混合液 0.05 ml 涂于致敏鼠右耳(R),左耳(L)仅涂以 1:4 医用生油-丙酮混合液 0.05 ml 为对照。在 d 5 处死动物,分别取两耳剪碎,置闪烁杯内,加 80%甲酸 1 ml H₂O₂ 1 ml 及辛醇 0.03 ml,于 70℃消化 4 h,加水溶性闪烁液 10 ml,用 YSJ-78 型全自动液体闪烁计数器测定 cpm。按公式计算小鼠 DHR 指数,即 DI = R(cpm)/L(cpm)。

用 ♂ICR 小鼠 24 ± 2 g, 60 只均分 6 组,分别于 d -8, d -4, d -1, d 0, d 2 iv FCE

50 ml/kg。结果表明,对照小鼠 DI 为 2.4,在 d -1 iv FCE 小鼠的 DI 为 1.7(p < 0.01)。但在 d -8, d -4, d 0, d 2 iv FCE 小鼠的 DI 与对照小鼠无显著差异(表 1)。

Tab 1. The cpm and DIs of DHR measured by radiometric ear assay in FCE 50 ml/kg iv treated TCR mice immunized with DNFB (n = 10, $\bar{x} \pm SD$) ***p < 0.01

Time after infusion	Right ($\times 10^{-2}$)	Left ($\times 10^{-2}$)	DI (R/L)
Control	138 ± 28	58 ± 7	2.4 ± 0.4
d -8	142 ± 41	56 ± 16	2.6 ± 0.6
d -4	87 ± 22	39 ± 10	2.3 ± 0.8
d -1	126 ± 34	75 ± 19	1.7 ± 0.4***
d 0	59 ± 18	26 ± 6	2.3 ± 0.4
d 2	71 ± 19	35 ± 17	2.1 ± 0.5

FCE 对小鼠 PM 吞噬功能的影响 参考文献⁽⁵⁾方法稍作改进,给小鼠 ip 0.5%水解乳蛋白 1.5 ml,次日 ip 5%CRBC 0.5 ml, 2 h 后 ip 2 ml RPMI-1640 培养液,揉摸腹部后处死小鼠。剖腹,吸出渗出液,置于装有玻片(0.8 × 2.5 cm)的培养瓶内,于 37℃孵育 2 h 后取出玻片,常规固定,染色。在油镜下计数 100 个 PM 中吞噬了 CRBC 的 PM 数(吞噬%)以及 100 个 PM 吞噬 CRBC 总数,求出每个 PM 平均吞噬 CRBC 数目(吞噬指数)。

取 ♂23 ± 2 g ICR 小鼠 50 只,分成 4 个给药组和 1 个对照组,每组 10 只,各给药组分别于 iv FCE 50 ml/kg 后 6 h、24 h、d 3 和 d 7 ip CRBC,对照组 iv 相同剂量 PS 后,用 2-3 只小鼠间隔同样时间 ip CRBC,测定各组 PM 吞噬功能。可见给药后 6 h, PM 胞浆内充满许多吞噬空泡,核被围在中间,大多数 PM 仅能吞噬 1-2 个 CRBC(图 1-A 见铜版图 2),吞噬%和 PI 均明显降低,与对照相比有非常显著意义(表 2)。对照组 PM 胞浆内无吞噬空泡,大多数 PM 能吞噬 4-5 个 CRBC,核被挤在一侧(图 1-B),

Tab 2. Phagocytic % and index of peritoneal macrophage uptaking CRBC in ICR mice after infusion of FCE 50 ml/kg. (n=10, $\bar{x}\pm SD$)
p<0.05, *p<0.01

Time after infusion	Phagocytic ratio (%)	Phagocytic index
Control	55±7	1.36±0.24
6 h	46±9**	1.04±0.18***
24 h	46±12	1.08±0.41
d 3	52±8	1.92±0.67**
d 7	49±10	1.23±0.35

PM 扫描电镜和透射电镜观察 ICR 小鼠均分 2 组, 给药组 iv FCE 50 ml/kg, 对照组 iv 等量 PS, 再同时 iv 0.5% 水解乳蛋白 1.5 ml, 24 h 后 ip 2 ml RPMI-1640 培养液, 处死动物, 吸出腹腔细胞悬液, 放入装有 0.8 cm 玻片的培养瓶内, 于 37℃ 孵育 2 h, 各取一份玻片按文献⁽⁶⁾方法制备 PM 扫描电镜样品。同时收集另一份玻片上的贴壁 PM, 常规制备 PM 电镜样品。

扫描电镜可见对照组 PM 多为球形, 表面呈脊状或鼓泡状突起, 高度伸展的扁平状 PM 占极少数。FCE 组 PM 直径增大, 主要为高度伸展的扁平状 PM, 表面绒毛增多, 有纤突。透射电镜可见 FCE 组 PM 大量吞噬 FCE, 细胞超微结构消失, 胞核浓缩变性, 少数吞噬少量 FCE 的 PM 胞浆内形成 FCE 吞噬小体, 内质网增多和扩张, 线粒体增加。

FCE 引起小鼠对 LPS 易感性的改变 ♂ 22.8±1.4 g 昆明小鼠 150 只, 分成 LPS 组, FCE 组和 HCA 组, 每组又按 LPS 剂量分成等比为 2 的 5 个剂量组, 每剂量组 10 只。LPS 各组 ip LPS 1.8-28.8 mg/kg, FCE 各组 iv FCE 30 ml/kg 和 ip LPS 0.225-3.6 ml/kg。HCA 组 iv FCE 30 ml/kg 和 ip LPS 3.6-57.6 mg/kg, 同时 ip HCA 100 mg/kg。注射 1 W 内观察死亡鼠数, 并用 Finney's 法计算各组 LD₅₀ 及 95% 可信限。

各组 LPS 的剂量-效应曲线见图 2, 表示

剂量与死亡鼠数均呈正相关, 以 LPS 组曲线为基准, FCE 组曲线明显左移, 提示死亡鼠数增加, HCA 组曲线明显右移, 提示死亡鼠数减少。LPS 组 LD₅₀ 为 6.3 mg/kg (4.6-8.5 mg/kg), FCE 组 0.6 mg/kg (0.4-0.8 mg/kg), HCA 组 15.5 mg/kg (10-23 mg/kg) 注射后 48 h 存活鼠均能康复。

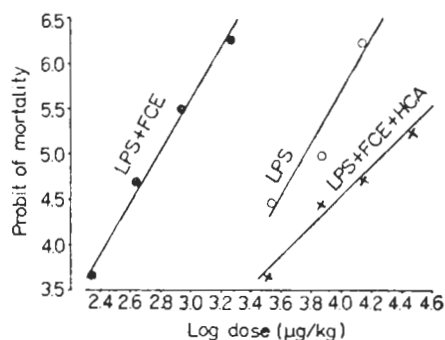


Fig 2. Dose-effect curves of LPS plus FCE 30 ml/kg or hydrocortisone acetate 100 mg/kg (10 mice/point)

讨 论

DHR 是由 T 细胞介导以巨噬细胞浸润为主的炎症样免疫反应, 其发生机理与细胞免疫有关⁽⁷⁾, DHR 的反应强度不仅取决于致敏 T 细胞的免疫功能, 而且取决于巨噬细胞对致敏 T 细胞激发后所释放巨噬细胞趋化因子的应答能力⁽⁷⁾。猴和豚鼠 iv FCE 后, 外周血 T 淋巴细胞转化反应有一过性升高趋势⁽⁸⁾, 说明 FCE 对 T 淋巴细胞无抑制作用。但 DHR 明显降低, 从而推测 FCE 对巨噬细胞的免疫功能有非特异性的一过性影响。

FCE 可使 PM 吞噬 CRBC% 和吞噬指数明显降低, 24 h 后恢复正常, d 3 可见 PI 继发性升高, 透射电镜和扫描电镜可见 iv FCE 鼠 PM 呈高度伸展, 表面微绒毛增多, 也可见吞噬活性增强。但是 PM 大量吞噬 FCE 后则进而发生明显退行性变, 引起巨噬细胞免疫和吞噬功能降低, 是巨噬细胞大量吞噬 FCE 迅速达到过饱和所致⁽⁹⁾。

小鼠 iv FCE 同时 ip LPS 后,其死亡率较单纯 ip LPS 组增加 10 倍,与 Lutz 等⁽¹⁰⁾的实验结果相吻合。可见小鼠 iv FCE 后对内毒素的敏感性增加,抗感染能力降低。在临床应用用于感染和中毒性休克的补液时,应注意 FCE 对巨噬细胞的免疫毒性作用。HCA 对 FCE 引起的抵抗力降低有明显的预防和治疗作用⁽¹¹⁾。

致谢 本文部分扫描电镜由中国科学院上海药物研究所戴志强担任。

参 考 文 献

- 1 丁训诚、张胜年、刘春芳、王根发、王炳森。中国药理学报 1983; 4:180
- 2 张胜年、刘春芳、董竞武、朱明社、竹云英、丁训诚。中华血液学杂志 1984; 5:166

- 3 Vadas MA, Miller J F, Gamble J, Whitelaw A. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1975; 49:670
- 4 Lefford MJ. *ibid* 1974; 47:270
- 5 韩铁岩、冯雷、刘慧人。上海免疫学杂志 1981; 1:223
- 6 陈丽娟、沈美玲、王美瑛、翟世康、刘明章。中国药理学报 1981; 2:200
- 7 Polak L. *Immunological aspects of contact sensitivity, an experimental study*. 1st ed. Basel: Karger, 1980; 43-96
- 8 丁训诚、刘春芳、王根发、袁正丽。中国药理学报 1982; 3:283
- 9 Miller ML, Stinnett JD, Clark LC. *J Reticuloendothel Soc* 1980; 27:105
- 10 Lutz J, Barthel U, Metzner P. *Circ Shock* 1982; 9:99
- 11 Vercellotti GM, Hammerschmidt DE, Craddock PR, Jacob HS. *Blood* 1982; 59:1299

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Jan; 7 (1) : 59-62

EFFECTS OF FLUOROCARBON BLOOD SUBSTITUTE ON MACROPHAGE FUNCTION AND HOST DEFENCE IN MICE

ZHANG Sheng-nian, LIU Chun-fang, DONG Jin-wu, DING Xun-cheng

(Dept Toxicology, Shanghai Institute of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, Shanghai 200003)

ABSTRACT Delayed hypersensitivity reactions (DHR) were depressed 24 h after iv fluorocarbon emulsion (FCE) 50 ml/kg. Phagocytic % and index of peritoneal macrophage (PM) uptaking chicken red blood cells (CRBC) were markedly diminished at 6 h after iv FCE. Scanning electron micrographs of PM 24 h after FCE iv showed that the cells extensively flattened; transmission electron microscopy of PM showed that the cells contained a large number of FCE covering the organelles. Infusion of FCE 30 ml/kg significantly increased the lethality of *E coli* endotoxin (LPS) treated mice by

tenfold, but infusion of FCE with ip hydrocortisone acetate (HCA) increased the survival of LPS-treated mice by twofold. The results indicated that FCE iv inhibited the phagocytic function of macrophage and resulted in an increased susceptibility of host to bacterial infection. Administration of ip HCA with iv FCE enhanced the host defence against infection.

KEY WORDS fluorocarbons; macrophages; electron microscopy; endotoxins; hydrocortisone; scanning electron microscopy